

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2003年 1月29日  
Date of Application:

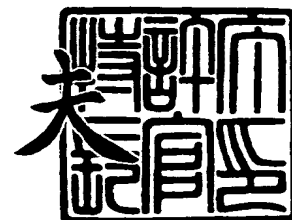
出願番号 特願2003-021047  
Application Number:  
[ST. 10/C]: [JP2003-021047]

出願人 野村 暢彦  
Applicant(s): 宮崎 均  
株式会社日本触媒

2004年 1月14日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井 康





【書類名】 特許願

【整理番号】 P02-0947

【提出日】 平成15年 1月29日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A61K 31/34

【発明の名称】 アポトーシス誘導剤

【請求項の数】 4

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市吾妻 4 - 1 0 - 3    1 0 4 - 3 0 3

    【氏名】 野村 暢彦

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市稲荷前 2 4 - 3 2

    【氏名】 宮崎 均

【特許出願人】

    【持分】 025/100

    【識別番号】 502104929

    【氏名又は名称】 野村 暢彦

【特許出願人】

    【持分】 025/100

    【住所又は居所】 茨城県つくば市稲荷前 2 4 - 3 2

    【氏名又は名称】 宮崎 均

【特許出願人】

    【持分】 050/100

    【識別番号】 000004628

    【氏名又は名称】 株式会社 日本触媒

【代理人】

    【識別番号】 100091096

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 平木 祐輔



## 【選任した代理人】

【識別番号】 100118773

【弁理士】

【氏名又は名称】 藤田 節

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100101904

【弁理士】

【氏名又は名称】 島村 直己

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015244

【納付金額】 21,000円

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0217688

【プルーフの要否】 要

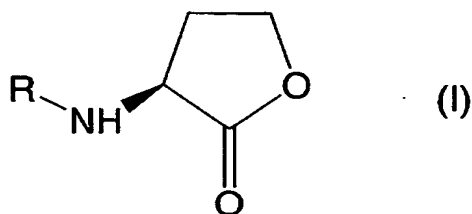
【書類名】 明細書

【発明の名称】 アポトーシス誘導剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 式I：

【化 1】



〔式中、Rは、炭素数4～30の直鎖状又は分枝状の置換されていてもよいアシル基である〕

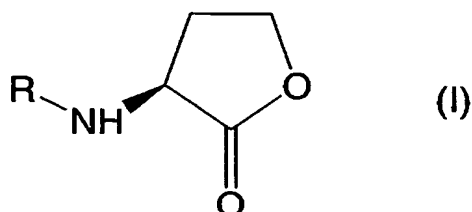
で表される化合物を含む、Akt阻害剤。

【請求項 2】 Rが、3位にオキソ基を有する炭素数4～30の直鎖状又は分枝状のアシル基である、請求項 1 に記載のAkt阻害剤。

【請求項 3】 請求項 1 又は 2 に記載のAkt阻害剤を含む、アポトーシス誘導剤。

【請求項 4】 式I：

【化2】



〔式中、Rは、請求項1と同義である〕

で表される化合物を用いて、細胞におけるアポトーシスを誘導する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、キナーゼの1つであるAktを阻害する化合物、及び該化合物を含むアポトーシス誘導剤に関する。

【0002】

【従来の技術】

アポトーシス (apoptosis) は、Kerr及びWyllie等によって提唱された生理的な細胞死の過程又は様式であり（非特許文献1及び2参照）、単なる細胞の崩壊現象ではなく、個体の生命を維持するために細胞の遺伝子にプログラムされた能動的な細胞死である。アポトーシスは、発生過程における体の形成だけではなく、成熟個体においても正常な細胞交替、神経系の維持、免疫系の成立など細胞社会の統制を図るために重要な役割を果たしている（非特許文献3及び4参照）。さらにアポトーシスは、基本的な生命現象のみならず、癌、自己免疫疾患、AIDSなどのウィルス感染症、アルツハイマー病などの神経変性疾患といった様々な疾病の発症にも密接に関わっていることが明らかになってきている（非特許文献5参照）。

【0003】

アポトーシスは、生理的及び病理的な条件下で様々なアポトーシス誘導要因によって引き起こされ、アポトーシス細胞に特徴的な形態学的変化と生化学的な変化により定義されている。アポトーシスは、正常な細胞が火傷や打撲といった過激な障害を受けて死に至る受動的な崩壊過程であるネクローシス（壊死）とは区別される。

#### 【0004】

アポトーシスの誘導には、ホルモンやサイトカインによるシグナル、成長因子の除去などの生物学的要因の他に、放射線や熱といった物理的要因及び薬物などの化学的要因があげられ、そのメカニズムは誘導要因によって様々であり、最終的にDNAの断片化を中心とする共通のプロセスを経て、細胞死が起こる。

#### 【0005】

アポトーシスは正常な発生・分化に不可欠な生理的細胞死であり、正常な生体組織の細胞回転などにおいて個々の細胞に起こっている。そのため、アポトーシスが過剰に抑制されると多くの機能障害の原因となってくる。

#### 【0006】

具体的にこれらアポトーシス抑制に起因する障害としては、癌、増殖性皮膚疾患、慢性関節リウマチ、HIV感染、肝炎、腎疾患等を挙げることができるが、いずれもまだ有効な治療剤がないのが現状であり、臨床上有用性の高い治療・改善薬が求められていた。

#### 【0007】

一方、近年、微生物が有する多種多様な認識及び応答機能の1つとして、クオラムセンシングと呼ばれる、周囲の菌体数を感知して応答する機構が知られている。この情報伝達機構にはオートインデューサーと呼ばれる物質が存在し、このオートインデューサーを介して微生物間での情報伝達が行われ、遺伝子の転写活性の促進、病原性の発現、抗生物質産生などの広範囲の生物化学的、生理学的機能の調節が行われている。このクオラムセンシングは、多くのグラム陰性菌で発見され、代表的なオートインデューサーとしてアシル化ホモセリンラクトン類が報告されている。そして、アシル化ホモセリンラクトン類は、微生物の多種多様な活性に関与していることが明らかとなっている。これらの活性としては、植物

病原菌であるエルウィニア・カロトボラ (*Erwinia carotovora*) 及び囊胞性繊維症の起因菌である緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) における細胞外酵素の産生、及びアグロバクテリウム・チュメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) から植物への T i プラスミドの導入等が知られている。

#### 【 0 0 0 8 】

しかし、アシル化ホモセリンラクトン類が、動物細胞の活性等に影響を及ぼすことに関する知見は極めて乏しく、さらには、細胞のアポトーシスに影響を及ぼすことについては、全く知られていなかった。

#### 【 0 0 0 9 】

##### 【非特許文献 1】

Br. J. Cancer 26, 239-257, 1972

##### 【非特許文献 2】

J. Pathol. 111, 85-94, 1973

##### 【非特許文献 3】

Science 154, 605-612, 1966

##### 【非特許文献 4】

Rev. Cell. Biol. 7, 663-698, 1991

##### 【非特許文献 5】

Lancet 341, 1251-1254, 1993

#### 【 0 0 1 0 】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、アポトーシス抑制に起因する障害の予防及び/又は治療に有用なアポトーシス誘導剤を提供することである。

#### 【 0 0 1 1 】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、前記課題を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、アシル化ホモセリンラクトン類が、細胞の生存に必須の酵素である Akt の活性を阻害し、効果的にアポトーシスを誘導することを見出し、本発明を完成させるに至った。

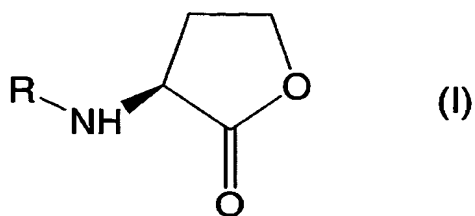
#### 【 0 0 1 2 】



即ち、本発明は以下の発明を包含する。

(1) 式I:

【化3】



〔式中、Rは、炭素数4～30の直鎖状又は分枝状の置換されていてもよいアシル基である〕

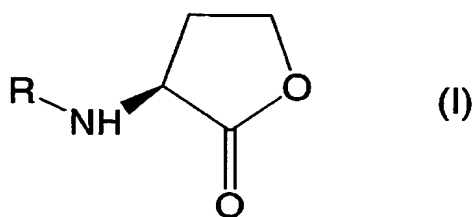
で表される化合物を含む、Akt阻害剤。

(2) Rが、3位にオキソ基を有する炭素数4～30の直鎖状又は分枝状のアシル基である、(1)に記載のAkt阻害剤。

(3) (1)又は(2)に記載のAkt阻害剤を含む、アポトーシス誘導剤。

(4) 式I:

【化4】



〔式中、Rは、(1)と同義である〕

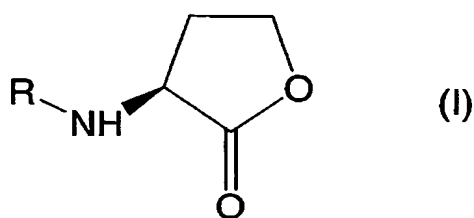
で表される化合物を用いて、細胞におけるアポトーシスを誘導する方法。

【0013】

【発明の実施の形態】

本発明における、式I:

【化5】



で表される化合物をアシル化ホモセリンラクトン類と称する。

【0014】

式Iにおける、Rは、炭素数4～30、好ましくは8～20、より好ましくは10～14の直鎖状又は分枝状の置換されていてもよいアシル基であり、置換基としては、ヒドロキシル基、オキシ基、メチル基等が挙げられる。非置換の飽和脂肪族アシル基、及び3位にオキシ基を有する飽和脂肪族アシル基が好ましい。また、直鎖状であることが好ましい。

【0015】

Rの具体例としては、特に限定されないが、例えば、ブチリル基、3-オキソブチリル基、3-ヒドロキシブチリル基、イソブチリル基、バレリル基、3-オキソバレリル基、イソバレリル基、3-オキソイソバレリル基、ピバロイル基、ヘキサノイル基、3-オキソヘキサノイル基、ヘプタノイル基、3-オキソヘプタノイル基、オクタノイル基、3-オキソオクタノイル基、ノナノイル基、3-オキソノナノイル基、デカノイル基、3-オキソデカノイル基、ウンデカノイル基、3-オキソウンデカノイル基、ラウロイル基、3-オキソドデカノイル基、トリデカノイル基、3-オ

キソトリデカノイル基、テトラデカノイル基、3-オキソテトラデカノイル基、ペンタデカノイル基、3-オキソペンタデカノイル基、パルミトイル基、3-オキソパルミトイル基、ヘプタデカノイル基、3-オキソヘプタデカノイル基、ステアロイル基、3-オキソステアロイル基、ノナデカノイル基、3-オキソノナデカノイル基、イコサノイル基、3-オキソイコサノイル基、トリアコンタノイル基、3-オキソトリアコンタノイル基、ミリストイル基、3-オキソミリストイル基及びビルボイル基等が挙げられる。

### 【0016】

式Iで表されるアシル化ホモセリンラクトン類の具体例としては、特に限定されないが、例えば、N-ブチリル-L-ホモセリンラクトン、N-(3-オキソブチリル)-L-ホモセリンラクトン、N-(3-ヒドロキシブチリル)-L-ホモセリンラクトン、N-イソブチリル-L-ホモセリンラクトン、N-バレリル-L-ホモセリンラクトン、N-(3-オキソバレリル)-L-ホモセリンラクトン、N-イソバレリル-L-ホモセリンラクトン、N-(3-オキソイソバレリル)-L-ホモセリンラクトン、N-ピバロイル-L-ホモセリンラクトン、N-ヘキサノイル-L-ホモセリンラクトン、N-(3-オキソヘキサノイル)-L-ホモセリンラクトン、N-ヘプタノイル-L-ホモセリンラクトン、N-(3-オキソヘプタノイル)-L-ホモセリンラクトン、N-オクタノイル-L-ホモセリンラクトン、N-(3-オキソオクタノイル)-L-ホモセリンラクトン、N-ノナノイル-L-ホモセリンラクトン、N-(3-オキソノナノイル)-L-ホモセリンラクトン、N-デカノイル-L-ホモセリンラクトン、N-(3-オキソデカノイル)-L-ホモセリンラクトン、N-ウンデカノイル-L-ホモセリンラクトン、N-(3-オキソウンデカノイル)-L-ホモセリンラクトン、N-ラウロイル-L-ホモセリンラクトン、N-(3-オキソドデカノイル)-L-ホモセリンラクトン、N-トリデカノイル-L-ホモセリンラクトン、N-(3-オキソトリデカノイル)-L-ホモセリンラクトン、N-テトラデカノイル-L-ホモセリンラクトン、N-(3-オキソテトラデカノイル)-L-ホモセリンラクトン、N-ペンタデカノイル-L-ホモセリンラクトン、N-(3-オキソペンタデカノイル)-L-ホモセリンラクトン、N-パルミトイル-L-ホモセリンラクトン、N-(3-オキソパルミトイル)-L-ホモセリンラクトン、N-ヘプタデカノイル-L-ホモセリンラクトン、N-(3-オキソヘプタデカノイル)-L-ホモセリンラクトン、N-ステアロイル-L-ホモセリンラク

トン、N-(3-オキソステアロイル)-L-ホモセリンラクトン、N-ノナデカノイル-L-ホモセリンラクトン、N-(3-オキソノナデカノイル)-L-ホモセリンラクトン、N-イコサノイル-L-ホモセリンラクトン、N-(3-オキソイコサノイル)-L-ホモセリンラクトン、N-トリアコンタノイル-L-ホモセリンラクトン、N-(3-オキソトリアコンタノイル)-L-ホモセリンラクトン、N-ミリストイル-L-ホモセリンラクトン、N-(3-オキソミリストイル)-L-ホモセリンラクトン及びN-ピルボイル-L-ホモセリンラクトン等が挙げられる。

#### 【0017】

特に、N-(3-オキソデカノイル)-L-ホモセリンラクトン、N-(3-オキソウンデカノイル)-L-ホモセリンラクトン、N-(3-オキソドデカノイル)-L-ホモセリンラクトン、N-(3-オキソトリデカノイル)-L-ホモセリンラクトン及びN-(3-オキソテトラデカノイル)-L-ホモセリンラクトンが好ましい。

#### 【0018】

本発明のアシル化ホモセリンラクトン類は、例えば、脂肪族カルボン酸又はそのエステルと環状アミノ酸との間にアミド結合を形成させることによって合成することができる。また、アシル化ホモセリンラクトン類は、例えば、Chhabra, S. R., P. Stead, N. J. Bainton, G. P. C. Salmond, G. S. A. B. Stewart, P. Williams, and B. W. Bycroft, J. Antibiot., 46, 441-454, 1993、Zhang, L., P. J. Murphy, A. Kerr, and M. E. Tate, Nature, 362, 446-448, 1993、Schaefer A.L., B. L. Hanzelka, A. Eberhard, and E. P. Greenberg, J. Bacteriol., 178, 2897-2901, 1996、Gao, J. G. and E. A. Meighen. J. Bacteriol., 175, 3856-3862, 1993などに記載された方法によって合成できる。

#### 【0019】

また、本発明のアシル化ホモセリンラクトン類は微生物によって生合成されるため、微生物を培養した培養物から当技術分野において通常用いられる方法によって分離精製することもできる。

#### 【0020】

本発明者らは、アシル化ホモセリンラクトン類と各種動物細胞を反応させ、ウェスタンブロッティング法によって、該細胞におけるAkt活性を測定したところ

、特定のアシル化ホモセリンラクトン類が、Aktのリン酸化活性を効果的に阻害することを見出した。

#### 【0021】

本発明において、Aktは、PI3K（ホスファチジルイノシチド3-OHキナーゼ）の下流で活性化するセリン／トレオニンキナーゼであり、PI3K-Akt経路は、生存シグナル伝達経路の1つとして知られている。また、Aktが、細胞におけるアポトーシスを阻害する活性を有することも報告されている（特表2002-528390）。

#### 【0022】

本発明において、アポトーシスとは当技術分野で通常用いられる意味を有し、すなわち、生理的条件下で細胞自らが積極的に引き起こす細胞死を意味する。アポトーシスの形態は、細胞核の染色体凝集、細胞核の断片化、細胞表層微絨毛の消失、クロマチンの凝縮を特徴とする。細胞は萎縮し、細胞の内容物が細胞外に放出されずにマクロファージなどの周囲の細胞にすみやかに取り込まれるので、炎症が引き起こされず、周囲の細胞に影響を与えない。一方、環境の悪化から引き起こされるネクローシス（壊死）は、細胞の内容物が放出される点で大きく異なる。

#### 【0023】

上記のような特徴から、細胞におけるアポトーシスは、様々な方法で検出することができる。アポトーシスの検出法としては、特に限定されないが、例えば、DNA結合性蛍光色素アミノベンズイミド（ヘキスト33342、33582及び333258など）などによる染色後に蛍光顕微鏡でクロマチン凝縮を観察する方法、断片化したDNAを遠心などにより抽出分離して比色法などによって定量する方法、断片化したDNAをアガロースゲル電気泳動で「ラダー」として検出する方法、断片化したDNAを組織化学的に検出するTUNEL（terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling）法などが挙げられる。

#### 【0024】

本発明のアポトーシス誘導剤によって、アポトーシスを誘導できる細胞は、特に限定されないが、植物細胞及び動物細胞が挙げられ、動物細胞のアポトーシスを特に効果的に誘導できる。

## 【0025】

本発明により、アシル化ホモセリンラクトン類が、癌細胞に対して効果的にAktの活性を阻害することが明らかとなったことから、アシル化ホモセリンラクトン類を癌細胞におけるAkt阻害剤として使用できる。さらに、癌細胞にアシル化ホモセリンラクトン類を作用させることによって、癌細胞の細胞生存率の低下及びクロマチンの凝集等が観察されたことから、本発明のアシル化ホモセリンラクトン類が、癌細胞に対し効果的にアポトーシスを誘導することも明らかとなった。従って、本発明のアシル化ホモセリンラクトン類を、抗癌剤における有効成分として使用できる。

## 【0026】

本発明において、Akt阻害剤とは、Aktの活性化、すなわちリン酸化を阻害する薬剤及び活性化Aktを不活性化する薬剤を意味し、例えば、動物細胞におけるAktの活性化を阻害する薬剤、Aktの細胞内における正常な局在化を阻害する薬剤、Aktを活性化する物質の作用を阻害する薬剤、Akt活性化物質を分解する薬剤などが含まれる。

## 【0027】

さらに、式Iで表されるアシル化ホモセリンラクトン類は、R基の種類によってAkt阻害活性が異なることから、R基を変更及び改変することによって、そのアポトーシス誘導効果を調節することができる。また、異なるR基を有する複数種のアシル化ホモセリンラクトン類を組み合わせる使用することにより、Akt活性の変化を制御し、薬理効果を調節することも可能であると考えられる。

## 【0028】

本発明のアシル化ホモセリンラクトン類を有効成分とするアポトーシス誘導剤によって治療できる疾患としては、特に限定されないが、例えば、卵巣、乳房、脾臓、皮膚、肺、脳、腎臓、肝臓、鼻咽頭腔、中枢神経系、前立腺、大腸、結腸、直腸、子宮頸部及び子宮内膜からなる群より選択される組織中に存在する癌、並びに増殖性皮膚疾患、慢性関節リウマチ、HIV感染、肝炎、腎疾患等のアポトーシスの抑制に起因する疾患が挙げられる。特に、大腸癌などの消化器系の癌、皮膚癌の治療において好適に使用される。

## 【0029】

本発明のアポトシス誘導剤において、アシル化ホモセリンラクトン類は、水和物であってもよい。さらに、本発明にかかるアシル化ホモセリンラクトン類は遊離した形態であってもよく、又はその薬理学的に許容される塩であってもよい。塩を形成する場合は、具体的にはアルカリ金属の付加塩、アルカリ土類金属の付加塩、アンモニウム塩、アミンの付加塩等を挙げることができるが、遊離した状態がより好ましい。

## 【0030】

次に本発明のアシル化ホモセリンラクトン類の投与剤型としては、例えば散剤、細粒剤、顆粒剤、錠剤、被覆錠剤、カプセル剤などの経口製剤、軟膏、貼付剤等の外用剤、坐剤及び注射用製剤等が挙げられる。製剤化の際には、通常の製剤担体を用いて常法により製造することができる。

## 【0031】

すなわち経口製剤を製造するにあたっては、アシル化ホモセリンラクトン類と賦形剤、さらに必要に応じて酸化防止剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、着色剤、矯味矯臭剤などを加えた後、常法により散剤、細粒剤、顆粒剤、錠剤、被覆錠剤、カプセル剤等とする。

## 【0032】

賦形剤としては、例えば乳糖、コーンスターチ、白糖、ブドウ糖、マンニトール、ソルビット、結晶セルロース、二酸化ケイ素などが、結合剤としては、例えばポリビニルアルコール、ポリビニルエーテル、メチルセルロース、エチルセルロース、アラビアゴム、トラガント、ゼラチン、シェラック、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリプロピレングリコール・ポリオキシエチレン・ブロックポリマー、メグルミンなどが、崩壊剤としては、例えば澱粉、寒天、ゼラチン末、結晶セルロース、炭酸カルシウム、炭酸水素ナトリウム、クエン酸カルシウム、デキストリン、ペクチン、カルボキシメチルセルロース・カルシウム等が、滑沢剤としては、例えばタルク、ポリエチレングリコール、シリカ、硬化植物油等が、着色剤としては医薬品に添加することが許可されているものが、矯味矯臭剤としては、ココア末

、ハッカ脳、芳香散、ハッカ油、竜脳、桂皮末等が用いられる。これらの錠剤・顆粒剤は、糖衣してもよく、その他必要により適宜コーティングしてもよい。

### 【0033】

また注射用製剤を製造する際には、アシル化ホモセリンラクトン類に pH 調整剤、溶解剤、等張化剤などと、必要に応じて溶解補助剤、安定化剤、酸化防止剤などを加えて、常法により製剤化する。

### 【0034】

外用剤を製造する方法は限定されず、常法により製造することができる。すなわち製剤化にあたり使用する基剤原料としては、医薬品、医薬部外品、化粧品等に通常使用される各種原料を用いることが可能である。

### 【0035】

使用する基剤原料として具体的には、例えば動植物油、鉱物油、エステル油、ワックス類、高級アルコール類、脂肪酸類、シリコン油、界面活性剤類、アルコール類、多価アルコール類、水溶性高分子類、粘土鉱物類、精製水などの原料が挙げられ、さらに必要に応じ、pH 調整剤、酸化防止剤、キレート剤、防腐防黴剤、着色料、香料などを添加することができるが、本発明にかかる外用剤の基剤原料はこれらに限定されない。また必要に応じて血流促進剤、殺菌剤、消炎剤、細胞賦活剤、ビタミン類、アミノ酸、保湿剤、角質溶解剤等の成分を配合することもできる。なお上記基剤原料の添加量は、通常外用剤の製造にあたり設定される濃度になる量である。

### 【0036】

本発明におけるアポトーシス誘導剤の有効成分であるアシル化ホモセリンラクトン類の臨床投与量は、投与の対象となる動物、症状、重症度、年齢、体重、合併症などによって異なり、また塩の種類・投与経路などによっても異なるが、通常、成人 1 日あたり  $1\mu\text{g}$ ~ $1\text{g}$  であり、好ましくは  $10\mu\text{g}$ ~ $200\text{mg}$  であり、さらに好ましくは  $20\mu\text{g}$ ~ $20\text{mg}$  である。

### 【0037】

本発明のアポトーシス誘導剤の投与対象としては、動物であれば特に限定されないが、哺乳動物、例えば、ウマ、犬、マウス、モルモット、ラット等が挙げら



れる。特に、ヒトに対して好適に使用される。

#### 【0038】

##### 【実施例】

以下の実施例において実験材料は、特に他に記載がない限り、以下に記載のものを使用した。

#### 【0039】

細胞培養に用いたダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM)、ウシ胎児血清 (FCS)、非必須アミノ酸 (NEAA)、ペニシリン/ストレプトマイシン (P/S) はSIGMA社から購入した。N-アシル-L-ホモセリンラクトン (AHL) の溶媒として用いたジメチルスルホキシド (DMSO) は和光純薬工業株式会社のものである。キナーゼ阻害剤であるPD98059、SB203580はCALBIOCHEM社から購入した。タンパク質の定量には、PIERCE社のBCA Protein Assay Reagentを使用した。抗体については以下の会社のものである。抗-リン酸化-Akt (Ser473) 抗体、抗-Cleaved型caspase-3 抗体、抗-Cleaved型caspase-9 (D330) 抗体、抗-Cleaved型PARP (D214) 抗体、HRP標識抗-ウサギIgG抗体はCell Signaling社。HRP標識抗-マウスIgG抗体はSANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY社。抗- $\alpha$ -チューブリン抗体 (Ab-1) はCALBIOCHEM社。

#### 【0040】

##### 実施例 1 Akt活性のウェスタンブロットによる解析

(1) CaCo-2細胞におけるアシル化ホモセリンラクトン刺激によるAkt活性の変化

ヒト大腸癌カルチノーマ細胞株CaCo-2はAmerican Type Culture Collection (ATCC) より購入し、10% FCS、1% NEAA、1% P/S (100 units/ml ペニシリン、100  $\mu$ g/ml ストレプトマイシン) を含むDMEM培地を用いて37℃、5% CO<sub>2</sub>存在下で培養した。

#### 【0041】

6cm ディッシュ (NUNC社) を用いて、1 ディッシュ当たりCaCo-2細胞を $6 \times 10^5$ 個まき、リン酸緩衝化食塩水 (PBS) (-) で2回洗浄後、1% NEAAを含む無血清DMEM培地で24時間培養した。その後、終濃度100  $\mu$ Mでホモセリンラクトン塩酸塩

、N-ブチリル-L-ホモセリンラクトン、N-(3-オキソヘキサノイル)-L-ホモセリンラクトン、N-(3-オキソドデカノイル)-L-ホモセリンラクトンをそれぞれ添加し、10分間反応させた。なお、精製されたアシル化ホモセリンラクトンは、目的とする終濃度の400倍になるようDMSOに溶解し、フィルター滅菌（ $\phi$  0.22  $\mu$ m）を行ったものを使用した。対照として終濃度0.25 %のDMSOを使用した。また、内部標準として $\alpha$ -チューブリンを用いた。

#### 【 0 0 4 2 】

反応後、冷PBS（-）で2回洗浄し、-80℃で凍結させた。氷上で細胞を融解し、溶解バッファー（50 mM HEPES、pH7.5、50 mM NaCl、1mM EDTA、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、1 % Triton X-100、10% グリセリン、10 mM ピロリン酸ナトリウム、1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>、100 mM NaF、1mM PMSF、10  $\mu$ g/ml アプロチニン、10  $\mu$ g/ml ロイペプチン）を200  $\mu$ l加え、スクレーパーで細胞を剥ぎ取った。これを氷上で20分間静置し、その後14000 rpm、4℃で15分間遠心分離し、上清を回収した。回収したタンパク質の濃度を測定し、50  $\mu$ g相当をSDS-PAGEに供した。泳動後PVDFメンブレンにブロットした。リン酸化Aktを測定する場合は、0.1% Tween 20（TBS-T）を含む5% スキムミルク/Tris緩衝化食塩水でブロッキングを行い、1次抗体にそれぞれ、抗-リン酸化-Akt（Ser437）抗体を、2次抗体にはHRP標識抗-ウサギIgG抗体を用いた。内部標準として使用した $\alpha$ -チューブリンは、ブロッキングを5% ウシ血清アルブミン（BSA）/TBS-Tで行い、1次抗体は抗- $\alpha$ -チューブリン（Ab-1）、2次抗体にはHRP標識抗-マウスIgG抗体を用いた。バンドの検出にはRenaissance™ Western Blot Chemiluminescence 255861 Reagent Plus（NEN社）又は、Western Blotting Luminol Reagent（SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY社）を使用した。結果を図1に示す。なお以下で言及する図中において、HSLはホモセリンラクトン塩酸塩を、C4-HSLはN-ブチリル-L-ホモセリンラクトンを、3-oxo-C6-HSLはN-(3-オキソヘキサノイル)-L-ホモセリンラクトンを、3-oxo-C12-HSLはN-(3-オキソドデカノイル)-L-ホモセリンラクトンを意味する。

#### 【 0 0 4 3 】

CaCo-2細胞においてAktは通常リン酸化（活性化）された状態にあるが、N-(3-オキソドデカノイル)-L-ホモセリンラクトンを添加した場合のみ、Aktのリン酸

化レベルが著しく低下した。すなわち、N-(3-オキシドデカノイル)-L-ホモセリンラクトンがAktの活性化を阻害することが明らかとなった。

#### 【 0 0 4 4 】

(2) CaCo-2細胞におけるN-(3-オキシドデカノイル)-L-ホモセリンラクトン濃度依存的なAkt活性の変化

細胞培養後、終濃度0  $\mu$ M (0.25% DMSO) 、1  $\mu$ M、10  $\mu$ M、30  $\mu$ M、100  $\mu$ MのN-(3-オキシドデカノイル)-L-ホモセリンラクトンをそれぞれ添加して、10分間反応させること以外は、(1)と同様にして、Akt活性をウェスタンブロットにより解析した(図2)。

#### 【 0 0 4 5 】

図2のバンドの強度をLAS-1000により定量、数値化した結果を図3に示す。10  $\mu$ M以上の濃度でAktのリン酸化レベルが有意に減少した。10  $\mu$ M、30  $\mu$ M、100  $\mu$ Mではそれぞれ無刺激時の79%、31%、14%にまで活性が低下した。

#### 【 0 0 4 6 】

以上から、CaCo-2細胞では、アシル化ホモセリンラクトン10  $\mu$ M以上で、Aktの活性が有意に阻害されることが明らかとなった。

#### 【 0 0 4 7 】

(3) CaCo-2細胞におけるN-(3-オキシドデカノイル)-L-ホモセリンラクトン刺激によるAkt活性の経時変化

細胞培養後、終濃度30  $\mu$ M及び100  $\mu$ MのN-(3-オキシドデカノイル)-L-ホモセリンラクトンを添加し、それぞれアシル化ホモセリンラクトンによる刺激時間を0、5、10、30、60分の短いタイムコース(図4)、0、10分、60分、2時間、4時間、6時間、8時間、10時間の長いタイムコース(図5)で行った他は、(1)と同様にして、ウェスタンブロットによりAkt活性を測定した。30  $\mu$ M刺激時のAktの活性阻害は5分をピークに60分まで持続し、2時間で基底レベルに戻った。一方、100  $\mu$ M刺激時のAkt活性阻害は5分をピークにして6時間まで持続した。

#### 【 0 0 4 8 】

(4) ブタ血管内皮細胞におけるN-(3-オキシドデカノイル)-L-ホモセリンラクトン刺激によるAkt活性の変化

ブタ血管内皮細胞株 (PEC) を、10% FCS、1% NEAA、1% P/S (100 units/ml ペニシリン、100  $\mu$ g/ml ストレプトマイシン) を含むDMEM培地を用いて37℃、5%  $O_2$ 存在下で培養した。

#### 【0049】

6cm ディッシュ (NUNC社) を用いて、1 ディッシュ当たりPEC細胞を $6 \times 10^5$  個まき、リン酸緩衝食塩水 (PBS) (-) で2回洗浄後、1% NEAAを含む無血清DMEM培地で24時間培養した。その後、終濃度100  $\mu$ Mでホモセリンラクトン塩酸塩、N-ブチリル-L-ホモセリンラクトン、N-(3-オキシヘキサノイル)-L-ホモセリンラクトン、N-(3-オキソドデカノイル)-L-ホモセリンラクトンをそれぞれ添加し、10分間反応させた。(1)と同様に、ウェスタンブロッティングにより、アシル化ホモセリンラクトン類がPEC細胞におけるAktの活性に与える影響を調べた。結果を図6に示す。

#### 【0050】

ウェスタンブロッティングの結果から、N-(3-オキソドデカノイル)-L-ホモセリンラクトンが、有意に、PEC細胞におけるAktの活性を低減させることが明らかとなった。

#### 【0051】

以上の結果は、特定のアシル化ホモセリンラクトン類が、PEC細胞におけるアポトーシスを誘導することを示している。

#### 【0052】

#### 実施例 2 Trypan blue染色による生存率の評価

3.5cm ディッシュ (NUNC社) に、CaCo-2細胞を $2 \times 10^5$  個まき、PBS (-) で2回洗浄後、1% NEAAを含む無血清DMEM培地で24時間培養した。各種薬剤 [終濃度1~100  $\mu$ MのN-(3-オキソドデカノイル)-L-ホモセリンラクトンを添加し、12時間培養した。対照として0.25% DMSOを使用した。その後、上清及びトリプシン-EDTA (TE) でディッシュから剥がした細胞を、室温、800 rpmで5分間遠心後、上清を取り除き、200  $\mu$ lのDMEMにて希釈した。うち50  $\mu$ lをエッペンチューブにとり、等量のTrypan blue染色液を加え、細胞数を血球計測盤にて測定した。このとき、測定対象とする死細胞数と生細胞数の合計を200個以上とした。

## 【0053】

N-(3-オキソドデカノイル)-L-ホモセリンラクトン濃度依存的に生存率の有意な低下が認められた。10  $\mu$ M、30  $\mu$ M、100  $\mu$ MのN-(3-オキソドデカノイル)-L-ホモセリンラクトンにより、生存率がそれぞれ90%、55%、51%にまで低下した(図7)。この30  $\mu$ M以上の濃度において有意に生存率を低下させるという結果は、ウェスタンブロット解析においてAkt活性阻害が30  $\mu$ M前後で顕著に見られたこととも一致する。また対照及び0.25% DMSO添加時の生存率はともに94%であり、1  $\mu$ M N-(3-オキソドデカノイル)-L-ホモセリンラクトン刺激時の生存率が94%であることからDMSOの生存率への影響は無視できるものと考えられる。

## 【0054】

実施例3 Hoechst33342染色によるクロマチン凝縮の観察とアポトーシスの判定

実施例2で観察されたCaCo-2の細胞死がアポトーシス又はネクローシスであるかを判定すべく、クロマチン染色の蛍光色素Hoechst33342を用いて形態学的に評価した。

## 【0055】

8ウェル培養スライド(Collagen I cell ware biocoat Becton Dickson)に、CaCo-2細胞を $2 \times 10^4$ 個まき、PBS(-)で2回洗浄後、1% NEAAを含む無血清DMEM培地で24時間培養した。3-オキソドデカノイルホモセリンラクトンを各濃度(1~100  $\mu$ M)にて添加し12時間培養後、細胞を4% パラホルムアルデヒド-3% スクロース/PBSにて固定し、蛍光色素ヘキスト33342を用いてクロマチン染色を行い、蛍光顕微鏡下で観察した。倍率400倍にて5視野をランダムに選び、アポトーシス細胞と正常細胞を計数、アポトーシス細胞の割合を算出し、これをn=1として3回以上試行した。

## 【0056】

N-(3-オキソドデカノイル)-L-ホモセリンラクトン10  $\mu$ M以上の濃度で、クロマチン凝縮を起こしたアポトーシス細胞が観察された。しかし0.25% DMSO、1  $\mu$ M N-(3-オキソドデカノイル)-L-ホモセリンラクトンでは正常細胞のみが観察された(図8)。クロマチン凝縮が観察されたアポトーシス細胞の計数によりアポトーシスの定量を行った結果を図9に示す。全細胞数に対するアポトーシス細胞の割

合は、10  $\mu$ M、30  $\mu$ M、100  $\mu$ MのN-(3-オキソドデカノイル)-L-ホモセリンラクトンでそれぞれ15%、39%、50%であった。この値は生存低下率とも一致する。したがって、N-(3-オキソドデカノイル)-L-ホモセリンラクトンによるCaCo-2の細胞死はアポトーシスによるものと判定された。

#### 【0057】

#### 実施例4 DNA断片化によるアポトーシスの評価

実施例2で観察されたCaCo-2の細胞死がアポトーシス又はネクローシスであるかを判定するための別法として、DNAの断片化を評価した。

#### 【0058】

CaCo-2細胞を $5 \times 10^6$ 個/15 cm ディッシュ (NUNC社) にまき、PBS (-) で2回洗浄後、1% NEAAを含む無血清DMEM培地で24時間培養し、N-(3-オキソドデカノイル)-L-ホモセリンラクトンを1  $\mu$ M～100  $\mu$ Mの各濃度で添加後12時間培養した。その後、上清及びTEでディッシュから剥がした細胞を、室温、800 rpmで5分間遠心し、上清を取り除いた。細胞を300  $\mu$ lのPBS (-) で懸濁し再度4℃、2500 rpmで5分間遠心して上清を取り除いた。細胞を細胞溶解バッファー [10 mM Tris-HCl (pH 7.4)、10 mM EDTA (pH 8.0)、0.5% Triton X-100] 300  $\mu$ lを加えて細胞溶解させ、氷上に10分置いてDNA断片を抽出した。これを4℃、14000rpmで、10分間遠心し、上清にRNase Aを加え、37℃で1時間温置した。さらにプロテイナーゼKを加え、50℃で30分間温置した。DNA断片抽出液をエタノール沈澱によって濃縮し、2%アガロースゲルで電気泳動を行った。ゲルをエチジウムブロミドで染色後、UVトランスイルミネーター下でDNA断片化を検出した。

#### 【0059】

それぞれ0  $\mu$ M、1  $\mu$ M、10  $\mu$ M、30  $\mu$ M、100  $\mu$ MのN-(3-オキソドデカノイル)-L-ホモセリンラクトン存在下で12時間培養したCaCo-2細胞において、DNAラダーを検出したところ、30  $\mu$ M以上の濃度にてラダーが確認された (図10)。

#### 【0060】

#### 実施例5 caspase活性の測定

caspase (caspase-3、caspase-9)、PARP (poly-ADP ribose polymerase) の活性を、ウェスタンブロット解析により抗-活性型 (Claved型) caspase抗体すな

わち、抗-Cleaved型caspase-3抗体、抗-Cleaved型caspase-9抗体(D330)、抗-Cleaved型PARP 抗体 (D214)をそれぞれ用いて、実施例 1 と同様に測定した。

#### 【 0 0 6 1 】

培養したCaCo-2細胞に、終濃度30 $\mu$ M、100 $\mu$ MのN-(3-オキソドデカノイル)-L-ホモセリンラクトンをそれぞれ添加し、経時的に0時間、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、10時間培養後のcaspase-3、caspase-9、PARP活性をウェスタンブロットにより解析した。結果を図 1 1 に示す。30 $\mu$ Mでは活性型caspase-3は刺激1時間後から検出され、その活性が4時間まで持続したのに対し、100 $\mu$ Mでは活性が刺激6時間後をピークにして10時間まで持続した。各メンブレンをリプローブしてCleaved型caspase-9、Cleaved型PARPを検出した。caspase-9活性は30 $\mu$ M刺激では1、2、4時間で活性が強く、微弱な活性が8時間まで持続したのに対し、100 $\mu$ M刺激では強い活性が8時間まで持続した。Cleaved型PARPについてもCleaved型caspase-9と同様の挙動を示した。

#### 【 0 0 6 2 】

次に、N-(3-オキソドデカノイル)-L-ホモセリンラクトンとの3時間の反応を、0、1、10、30、100 $\mu$ Mの各濃度にて行い、caspase、PARP活性を測定した。図 1 2 に示すように、30 $\mu$ M、100 $\mu$ Mの濃度においてのみCleaved型caspase、Cleaved型PARPが検出された。この結果はウェスタンブロット解析によるAkt活性阻害、生存率低下やアポトーシス細胞出現が30 $\mu$ M以上で顕著に起こったこととも一致した。

#### 【 0 0 6 3 】

##### 【発明の効果】

本発明により、細胞におけるアポトーシスを効果的に誘導することができ、アポトーシス抑制に起因する障害の予防及び/又は治療に対する有用な手段が提供される。

##### 【図面の簡単な説明】

##### 【図 1】

CaCo-2細胞におけるDMSO、ホモセリンラクトン塩酸塩、N-ブチリル-L-ホモセリンラクトン、N-(3-オキソヘキサノイル)-L-ホモセリンラクトン及びN-(3-オキ

ソドデカノイル)-L-ホモセリンラクトン刺激によるAkt活性の変化を表す図である。

【図 2】

CaCo-2細胞におけるN-(3-オキシドデカノイル)-L-ホモセリンラクトン濃度依存的なAkt活性の変化を表す図である。

【図 3】

図 2 のリン酸化Aktのバンドの強度をLAS-1000により定量、数値化した結果を表す図である。

【図 4】

CaCo-2細胞におけるN-(3-オキシドデカノイル)-L-ホモセリンラクトン刺激によるAkt活性の経時変化を表す図である。

【図 5】

CaCo-2細胞におけるN-(3-オキシドデカノイル)-L-ホモセリンラクトン刺激によるAkt活性の経時変化を表す図である。

【図 6】

ブタ血管内皮細胞におけるDMSO、ホモセリンラクトン塩酸塩、N-ブチリル-L-ホモセリンラクトン、N-(3-オキシヘキサノイル)-L-ホモセリンラクトン及びN-(3-オキシドデカノイル)-L-ホモセリンラクトン刺激によるAkt活性の変化を表す図である。

【図 7】

アシル化ホモセリンラクトン存在下における細胞生存率をTrypan blue染色によって評価した結果である。

【図 8】

アシル化ホモセリンラクトン存在下における細胞のアポトーシスをHoechst 33342染色によるクロマチン凝縮で判定した結果である。

【図 9】

クロマチン凝縮が観察されたアポトーシス細胞の計数によりアポトーシスの定量を行った結果である。

【図 1 0】



CaCo-2の細胞死がアポトーシス又はネクローシスであるかを判定するために、DNAの断片化を評価した結果である。

【図 1 1】

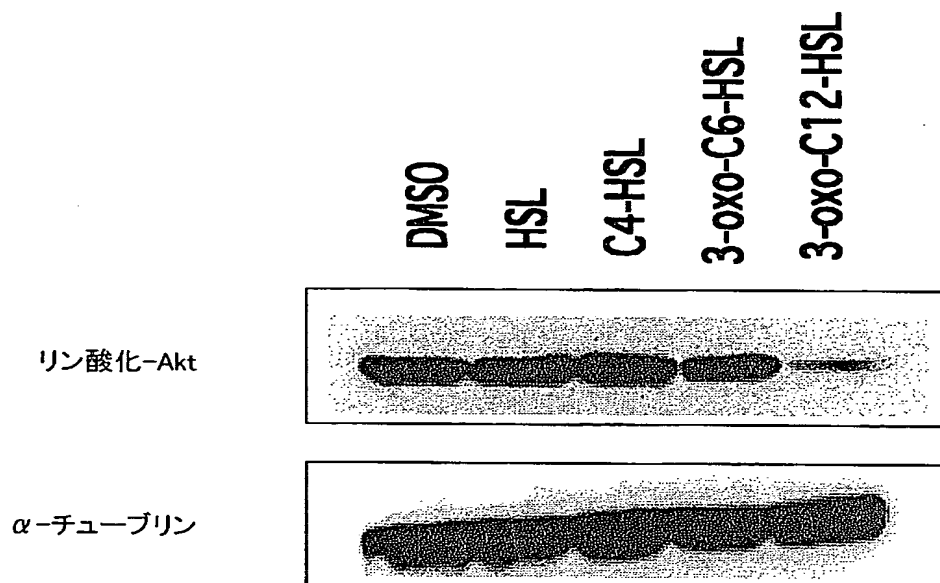
アシル化ホモセリンラクトン存在下におけるcaspase活性の培養時間依存性を、ウェスタンブロットによって測定した結果である。

【図 1 2】

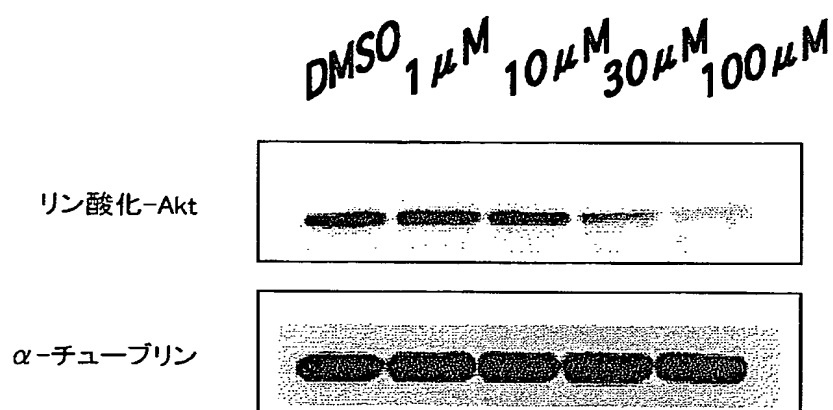
caspase活性のアシル化ホモセリンラクトン濃度依存性を、ウェスタンブロットによって測定した結果である。

【書類名】 図面

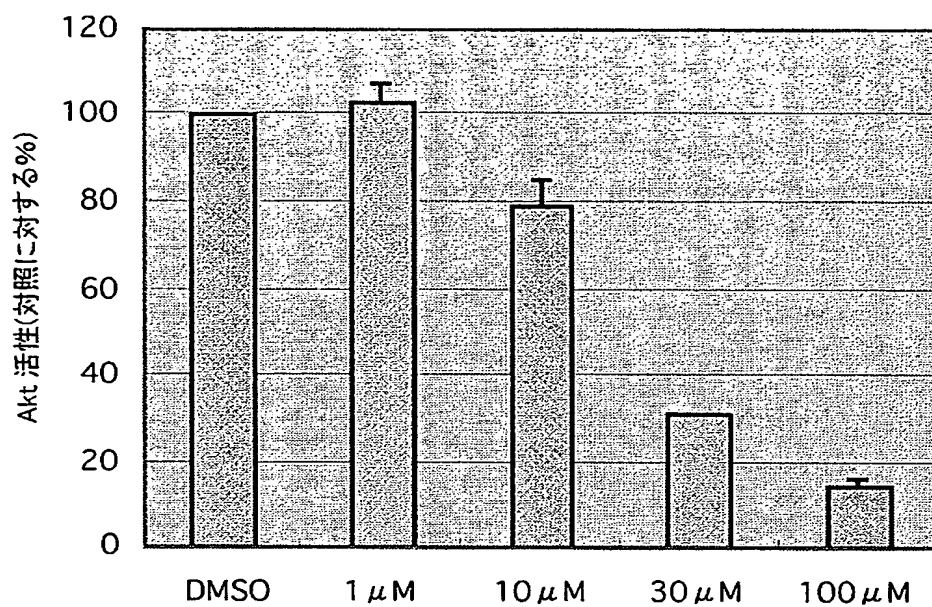
【図 1】



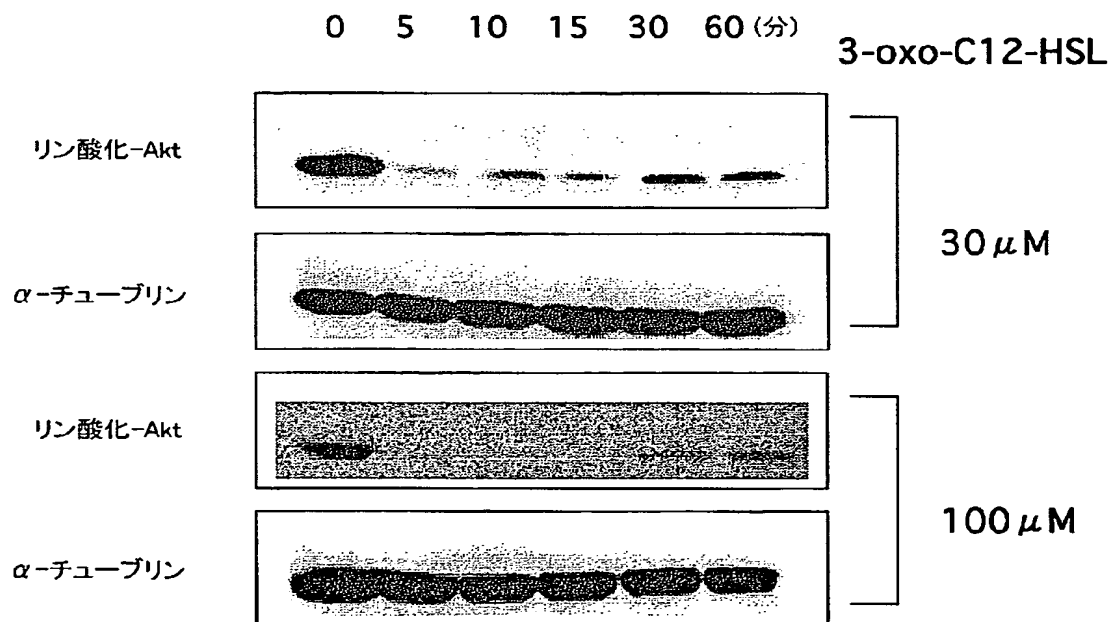
【図 2】



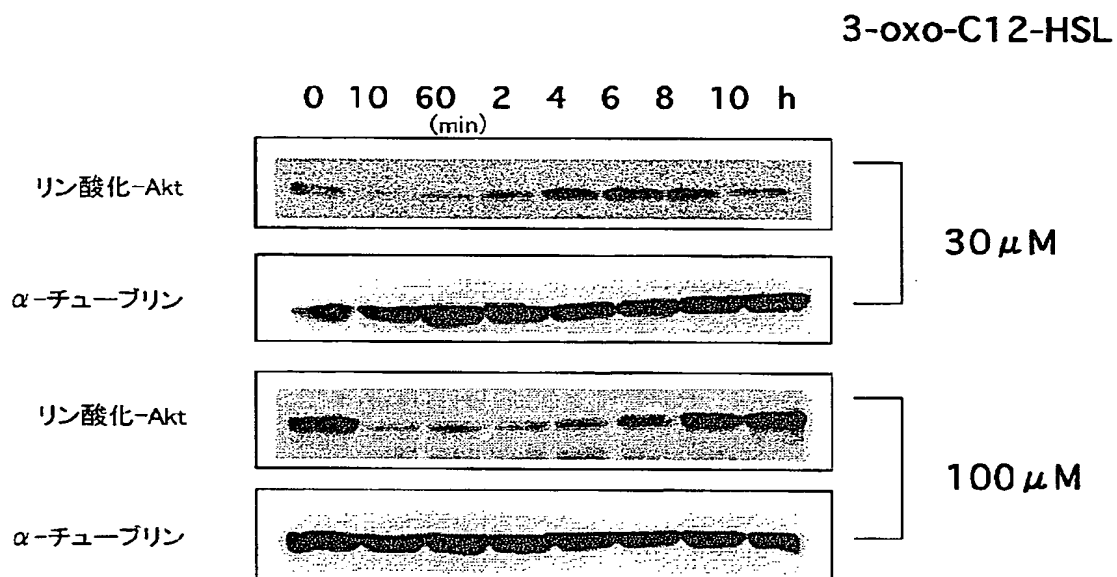
【図 3】



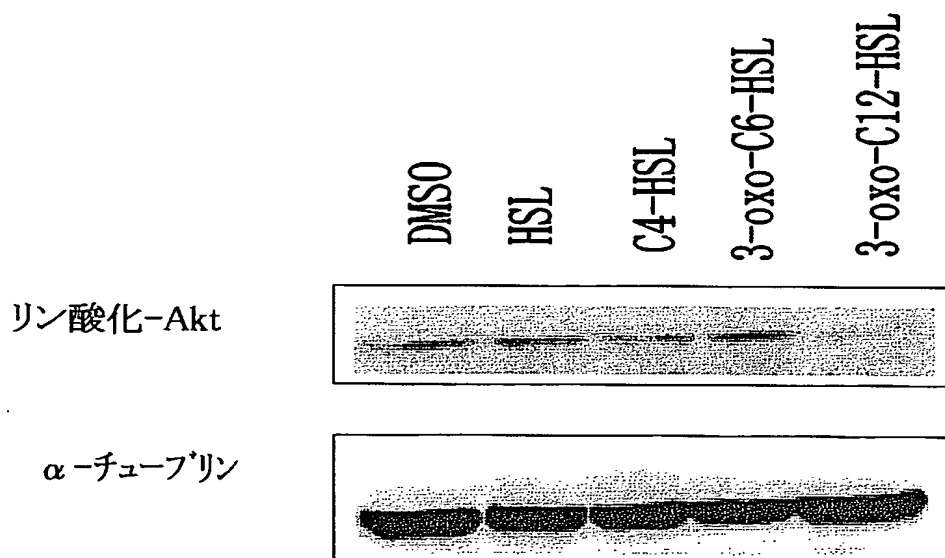
【図 4】



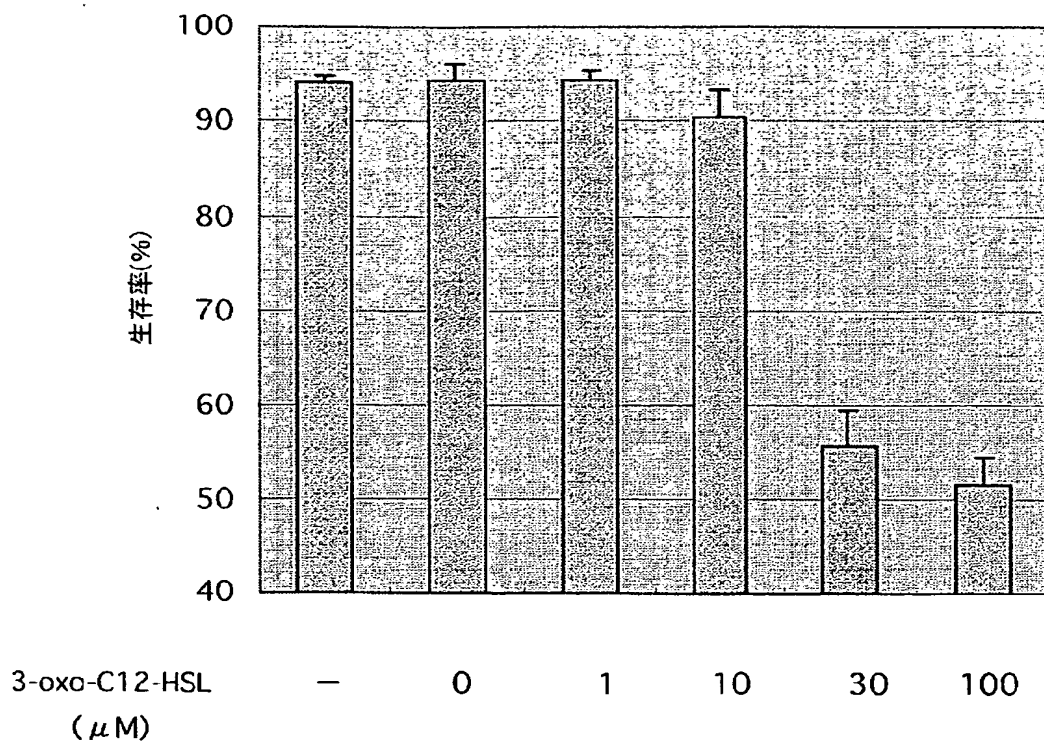
【図 5】



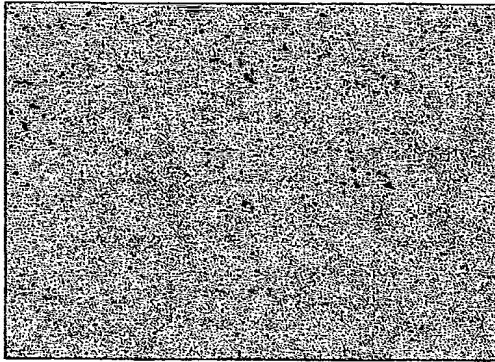
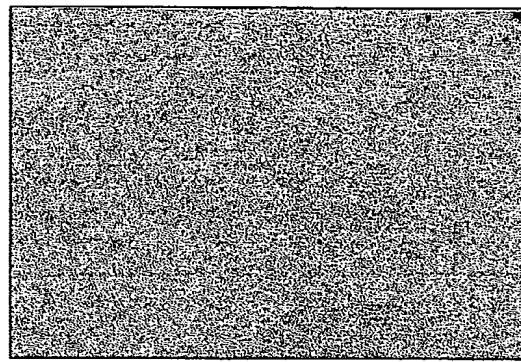
【図 6】



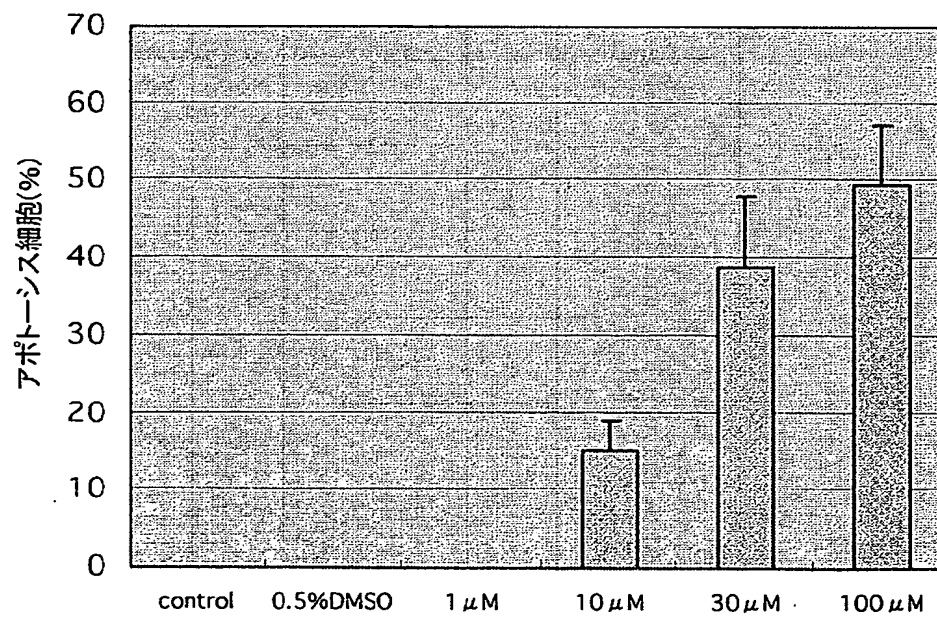
【図 7】



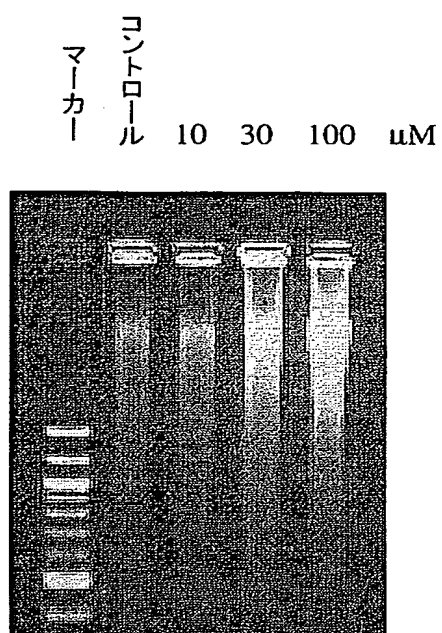
【図8】

1  $\mu$ M 3-oxo-C12-HSL30  $\mu$ M 3-oxo-C12-HSL

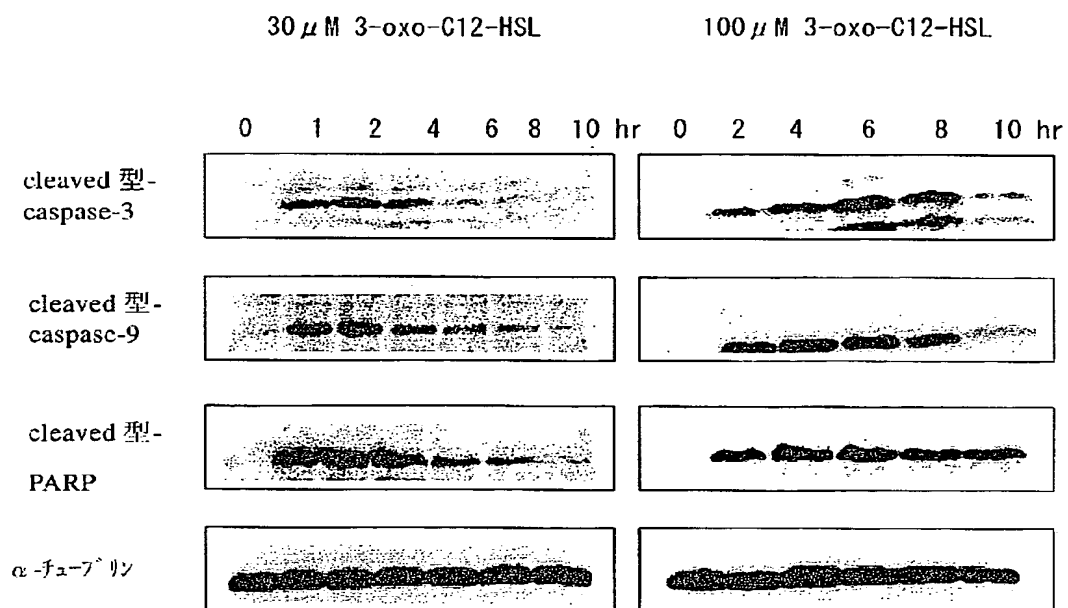
【図9】



【図 10】

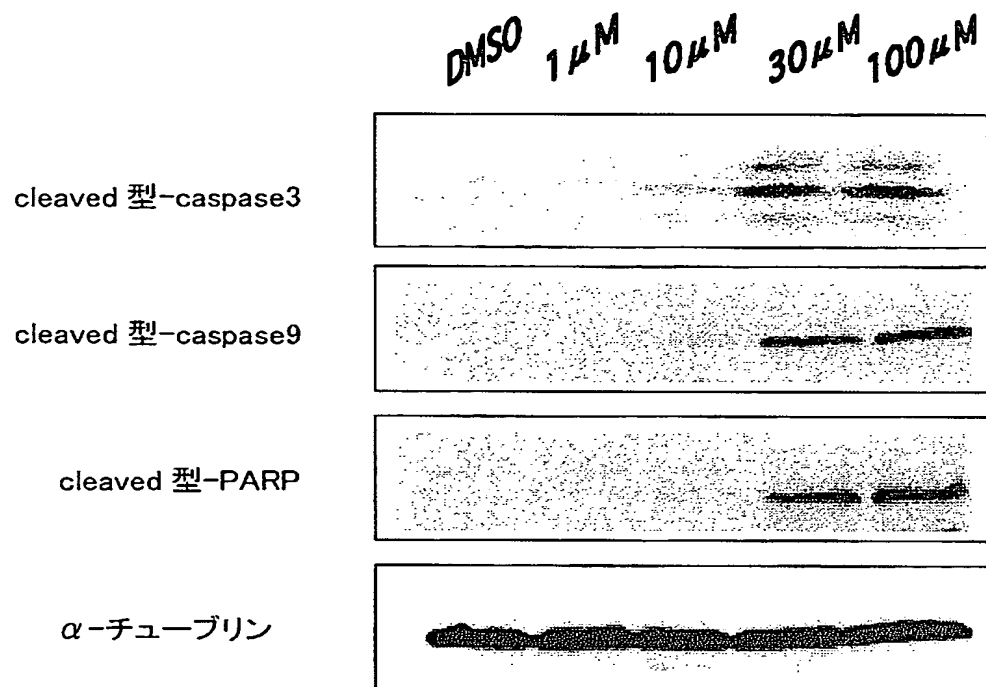


【図 11】





【図 12】



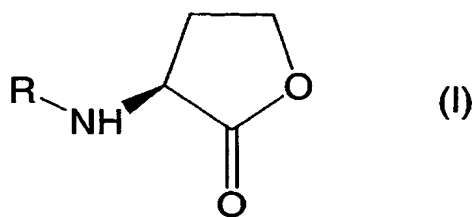
【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明の課題は、アポトーシス抑制に起因する障害の予防及び/又は治療に有用なアポトーシス誘導剤を提供することである。

【解決手段】 式I：

【化1】



〔式中、Rは、炭素数4～30の直鎖状又は分枝状の置換されていてもよいアシル基である〕

で表される化合物を含む、Akt阻害剤。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 0 2 1 0 4 7

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 5 0 2 1 0 4 9 2 9 ]

1. 変更年月日 2 0 0 2 年 3 月 2 5 日

[変更理由] 新規登録

住 所 茨城県つくば市吾妻 4 - 1 0 - 3 1 0 4 - 3 0 3

氏 名 野村 暢彦

特願 2 0 0 3 - 0 2 1 0 4 7

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 0 0 0 0 0 4 6 2 8 ]

1. 変更年月日	2 0 0 0 年 1 2 月 6 日
[変更理由]	住所変更
住 所	大阪府大阪市中心区高麗橋 4 丁目 1 番 1 号
氏 名	株式会社日本触媒

特願 2 0 0 3 - 0 2 1 0 4 7

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 5 0 3 0 3 9 9 1 2 ]

1. 変更年月日

2 0 0 3 年 1 月 2 9 日

[変更理由]

新規登録

住 所

茨城県つくば市稲荷前 2 4 - 3 2

氏 名

宮崎 均